



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA

ADRIANO FRANCISCO ALVES

**Estudo comparativo do efeito de warifteína e metil-warifteína,
alcaloides de *Cissampelos sympodialis* ECHL
(Menispermaceae), no processo inflamatório agudo.**

João Pessoa – Paraíba

2014

ADRIANO FRANCISCO ALVES

**Estudo comparativo do efeito de warifteína e metil-warifteína,
alcaloides de *Cissamplelos sympodialis* ECHL
(Menispermaceae), no processo inflamatório agudo.**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal da Paraíba,
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Piuvezam
ORIENTADORA

João Pessoa – Paraíba

2014

A474e *Alves, Adriano Francisco.*

Estudo comparativo do efeito de warifteína e metil-warifteína, alcaloides de *Cissampelos sympodialis* ECHL (Menispermaceae), no processo inflamatório agudo / Adriano Francisco Alves. – João Pessoa : [s.n.], 2014.
60 f. : il.

Orientadora: Márcia Regina Piuvezam.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Inflamação aguda. 2. Edema. 3. Warifteína. 4. Metil-warifteína

**Estudo comparativo do efeito de warifteína e metil-warifteína
alcaloides de *Cissampelos sympodialis* ECHL
(menispermaceae) no processo inflamatório agudo.**

ADRIANO FRANCISCO ALVES

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^a. Márcia Regina Piuvezam (**Orientadora**)
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)

Prof. Dr. Davi Antas e Silva
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)

Prof. Dr. Giciane Carvalho Vieira
(Departamento de Morfologia – UFPB)

"Somente um principiante que nada sabe sobre ciência diria que a ciência prejudica a fé. Se você realmente estudar a ciência, ela o levará para mais perto de Deus".

Candece Adams

**Dedico este trabalho a Deus e minha família,
por que eles são à base de tudo em minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, pela oportunidade de evoluir moralmente todos os dias e por poder conhecê-lo mais.

Aos meus pais, Severino Francisco Alves e Lourdeci da Silva Alves, pela educação, amor e carinho. **A minha irmã, Andréa da Silva Alves**, uma grande amiga, um porto seguro, minha inspiração e a mulher que mais acredita e investe em mim de todo o mundo. Obrigada irmã por tudo, TE AMO. **Ao meu irmão, Adelson Francisco Alves**, por todo apoio. **A minha sobrinha, Gisele Fernanda Gomes da Silva**, por todo amor que tem pelo tio, TE AMO malvada. **Aos meus familiares**, avôs, tio(a)s, primo(a)s, e aos agregados da família que juntos entre alegrias e desavenças dão sentindo a minha caminhada. Obrigada por todos os nossos momentos família, pelo amor e carinho.

Aos meus amigos da igreja, meu tesouro, obrigado por me amarem como sou, por contribuírem por meu crescimento e por não desistirem de mim mesmo tão ausente nos últimos dias.

Aos amigos da graduação, por compartilhar os melhores e mais ricos momentos da minha vida. Especialmente Priscylla, Sandra e Fernandinha que foram o diferencial da minha graduação. Mesmo que o término da graduação não nos permita mais a intimidade e a cumplicidade de outrora, guardarei na lembrança todos os nossos momentos.

Aos Professores da graduação, obrigado por confiar a nós todo o conhecimento que possuem, por nos ensinar ciência, estimular nosso melhor e acreditar em nosso potencial. De maneira especial às professoras **Bagnólia Araújo da Silva, Zélia Braz e Inês Freitas**. Sobretudo meus sinceros agradecimentos aos **Professores Doutores Davi Antas e Silva e Márcia Regina Piuvezam**, que me iniciaram no ensino e pesquisa, me ensinaram a ser mais crítico, me ensinaram didática, patologia, imunologia, e acima de tudo me ensinaram respeito ao próximo e o valor de uma verdadeira amizade.

Aos que constroem o **Laboratório de Imunofarmacologia**, um local que me fez aprender ciência, onde fiz grandes amigos. Dentre eles, **Hermann, Fagner, Laércia, Talissa, Ana Luisa, Talita, Rachel, Raquel, Allysson, Guilherme, Amanda, Danilo, Éssia, Larissa, Prof. Giciane** e tantos que passam na nossa vida e nos ensinam a sermos melhores e entendermos que acompanhado podemos chegar mais longe.

A minha orientadora, a Professora Doutora Márcia Regina Piuvezam, um exemplo de profissional. Agradeço imensamente a oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, desde o 2º período, mesmo quando não sabia nem o que era um linfócito....rsrsrs , as conversas científicas, os conselhos positivistas de um futuro melhor e a confiança depositada em mim, a orientação de fazer o mestrado, enfim...meu **MUITO OBRIGADO**.

Aos professores do laboratório de Imunologia, Sandra Mascarenhas, Cláudio Bezerra e Giciane Carvalho Vieira pela contribuição sempre que possível.

A meu orientador da monitoria, Professor Doutor Davi Antas e Silva, um grande profissional. Agradeço muito a você por ter me dado essa oportunidade de desenvolver a patologia ao seu lado e de tantos outros professores com tantos cursos diferentes. Isso só me fez crescer e entender que com estudo e dedicação podemos chegar ao nosso objetivo. Foi a partir da disciplina ministrada por você, que pude “me encontrar” e decidir ser um **patologista**, contribuindo para ciência com a arte de estudar e ensinar sobre doenças.

A professora Giciane Carvalho Vieira, professora da disciplina de Histologia Humana. Disciplina essa que me fascinou e norteou minha carreira profissional, mesmo nós assistindo uma aulinha de 3h seguidas depois do almoço das segunda e quartas, foram essas aulas que me direcionaram e hoje agradeço a Deus e a você por ter colocado em mim essa tão valiosa ferramenta, tantas vezes vista como chata ou sem valor, porém tão linda e de imensurável aplicabilidade que é a ferramenta histológica.

Aos professores membros da Banca Examinadora **Davi Antas e Silva e Giciane Carvalho Vieira**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba, que estiveram presentes durante toda a minha graduação, participando direta ou indiretamente para realização desse sonho. **Aos técnicos de laboratório, aos funcionários do Biotério Dr. Thomas George**, por tornar possível a execução de nossos projetos.

A Universidade Federal da Paraíba pela estrutura física, recursos humanos e o estímulo à pesquisa que proporcionaram minha formação.

RESUMO

Warifteína (W) e metil warifteína (MW) são alcaloides de *Cissampelos sympodialis*, conhecida popularmente como milona e orelha de onça e, utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas afecções. Estudos prévios demonstram que o extrato hidroalcoólico das folhas da planta e a warifteína, alcaloide bisbenzilisoquinolínico, apresentam efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos. Esse estudo avaliou o efeito do tratamento oral de camundongos com W ou MW na formação do edema de pata induzido por agentes flogísticos, no extravasamento vascular e na migração celular em modelos de inflamação aguda. Camundongos Swiss (n=4 - 6) foram tratados com solução salina tamponada com fosfato – PBS, indometacina 10mg/kg, warifteína ou metil warifteína nas doses de 2mg/kg e 10 mg/kg e, uma hora após foram administrados os agentes flogístico nas patas esquerdas, carragenina, prostaglandina E2 (PGE₂) ou bradicinina e nas patas direitas PBS. Os edemas foram medidos em 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas para a carragenina, 15, 30 e 60min para a PGE₂ e 15 e 30min para a bradicinina, com auxílio de paquímetro. A permeabilidade vascular foi avaliada pela injeção intraperitoneal de solução de ácido acético e, as concentrações de proteína foram quantificadas por espectrofotometria usando azul de evans. A migração de célula foi avaliada pela injeção intraperitoneal de zimosan, com consequente lavado peritoneal e contagem dessas células por microscopia óptica comum. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA com pós teste de Tukey utilizando o GraphPadPrism, versão 5.0. O tratamento oral com a W reduziu o edema de pata induzido por carragenina ou prostaglandina E2, efeito esse não observado com o tratamento com MW, a inibição do edema ocorreu por vias independentes de bradicinina. A W e a MW reduziram o extravasamento vascular, contudo sem inibir a migração celular associada à inflamação. Portanto, os resultados sugerem que warifteína é uma provável droga anti-edematogênica devido à inibição da formação de edema de pata induzido por agentes flogísticos e por diminuição da permeabilidade vascular, características essas não observadas na metil-warifteína.

Palavras-chave: Inflamação aguda, edema, warifteína e metil warifteína.

ABSTRACT

Warifteíne (W) and methyl warifteíne (MW) are alkaloids from *sympodialis Cissampelos*, popularly known as Milona and orelha de onça and used in folk medicine to treat various diseases. Previous studies showed that the hydroalcoholic extract of the leaves and warifteíne, bisbenzilisquinolínico alkaloid, exhibit anti-inflammatory and antiallergic effects. This study evaluated the effect of oral treatment of mice with W or MW in the formation of paw edema induced by phlogistic agents in vascular leakage and cell migration in models of acute inflammation. Swiss mice (n = 4 - 6) were treated with phosphate buffered saline - PBS, 10mg/kg indomethacin, warifteíne or methyl warifteíne at doses of 2mg/kg and 10 mg / kg and were administered one hour after the phlogistic agents in left paws, carrageenan, prostaglandin E2 (PGE2) or bradykinin and right paws in PBS. Edema was measured at 1, 2, 3, 4, 6 and 24 hours for carrageenan, 15, 30 and 60 minutes for PGE2 and 15 for 30min and bradykinin were measured with calipers. The vascular permeability was assessed by intraperitoneal injection of acetic acid, and protein concentrations were quantified spectrophotometrically using Evans blue. The cell migration was assessed by intraperitoneal injection of zymosan, with consequent peritoneal lavage and cell counts by a simple optical microscope. Statistical analyzes were performed using ANOVA with Tukey post test using GraphPadPrism, version 5.0. Oral treatment with W reduced paw edema induced by carrageenin and prostaglandin E2, this effect was not observed with treatment with MW inhibition of edema was independent pathways occurred by bradykinin. MW and AW reduced the vascular leakage, but without inhibiting cell migration associated with inflammation. Therefore, the results suggest that warifteíne is a likely anti-edema due to inhibition of paw edema induced by phlogistic agents and decreased vascular permeability drug, these features not found in methyl-warifteíne.

Keywords: Acute inflammation, edema, warifteíne and methyl warifteíne.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solução de Turk

Tabela 2. Salina

Tabela 3. Solução salina tamponada (PBS)

Tabela 4. Tampão Fosfato pH 7,2 utilizado no corante May-Grunwald-Giemsa

Tabela 5. Corante May-Grunwald

Tabela 6. Corante Giemsa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Folhas da planta *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae).

Figura 2: Estrutura química genérica de W e MW.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da warifteina e metil-warifteina no edema de pata por carragenina.

Gráfico 2. Efeito da warifteina e metil-warifteina no edema de pata por prostaglandina E2 e bradicinina

Gráfico 3. Efeito da warifteina e metil-warifteina na permeabilidade vascular.

Gráfico 4. Efeito da warifteina e metil-warifteina na migração de células - Peritonite

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS: Ácido Acetilsalicílico

AA:Ácido araquidônico

ATP: Trifosfato de Adenosina

B1 e B2: Subtipos de receptores da bradicinina

BK: Bradicinina

COX: Enzima ciclo-oxigenase

CRL +: Grupo controle positivo

CRL -: Grupo controle negativo

GPCR: Receptores acoplados a proteína G

GR: Receptores nucleares para glicocorticoides

H: Horas

Ig: Imunoglobulina

IgE- Imunoglobulina E

IL- Interleucina

I.P.: intraperitoneal

KCl -Cloreto de potássio

LTs: Leucotrienos

MAP: tirosina cinase ativada por mitógeno

MN- Mononucleares

MW: metil warifteína

Na₂HPO₄- Fosfato de sódio dibásico

NaCl – Cloreto de sódio

NaH₂PO₄: Fosfato de sódio monobásico

NF-κB: (*Nuclear Factor-KappaB*)- Fator de transcrição nuclear-κB

NO- óxido nítrico

°C- Graus Celcius

OVA: Ovalbumina

OMS- Organização Mundial da Saúde

p38 MAPK – (*Mitogen-activated protein kinases 38*)- Proteína cinase ativada por mitógeno

PAF – (*Platelet Activating factor*)- fator de ativação plaquetária

PBS - Solução salina tamponada

PG: Prostaglandina

PGD₂: Prostaglandina D₂

PGE₂: Prostaglandina E₂

PGF₂: Prostaglandina F₂

PGI₂: Prostaciclina

PMN – Polimorfonucleares

q.s.p.- Quantidade Suficiente Para

TLR4- (*Toll-like receptor 4*) - receptor Toll-like 4

TNF-α – (*Tumor necrosis factor-alpha*) - Fator de necrose tumoral-α

v/v- Volume para volume

W: warifteína

Sumário

1. Introdução	20
1.1 Inflamação	20
1.2. Inflamação Aguda.....	21
1.3.Mediadores Inflamatórios.....	22
1.4. O Uso de Plantas Medicinais.....	24
1.5. <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. (Menispermaceae).....	25
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. Material e Métodos	32
3.1. Animais.....	32
3.2. Preparo da solução do alcaloide	32
3.3. Tratamento dos animais.....	32
3.4. Edema de pata induzido por agentes flogísticos.....	32
3.5. Avaliação da permeabilidade vascular	33
3.6. Migração celular para o peritônio induzido por <i>zimosan</i>	33
3.7. Contagem de células do lavado peritoneal	34
3.8. Análise estatística	34
3.9. Substâncias e sais	34
3.10. Soluções.....	35
3.11. Aparelhos.....	37
4. Resultados.....	39
4.1. Efeito da warifteina e metil-warifteina no edema de pata induzido por carragenina.....	39
4.2. Efeito da warifteina e da metil-warifteina no edema de pata induzido por mediadores da inflamação, prostaglandina E2 (PGE2) ou bradicinina	41
4.3. Efeito da warifteina e metil-warifteina na permeabilidade vascular induzida por ácido acético.	Erro! Indicador não definido.
4.4. Efeito da warifteina e metil-warifteina na migração de células inflamatórias induzida por zimosan.....	45
5. Discussão	47
6. Conclusões.....	53
7. Referências	55

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Inflamação

A inflamação é uma complexa resposta fisiológica que ocorre em tecidos vivo-vascularizados, contra invasores estranhos, como vírus, bactérias, fungos, parasitas, entre outros e se caracteriza pela saída de líquidos e células dos vasos para o tecido lesado podendo culminar com a restauração do tecido lesado (MEDZHITOV, 2010).

Os sintomas clínicos da inflamação foram definidos pela primeira vez pelo médico romano Cornelius Celsus no século I. Estes sintomas vieram a ser conhecidos como os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor (MEDZHITOV, 2010). Porém, o quinto sinal cardinal, perda da função, foi adicionado por Rudolph Virchow, 18 séculos após, em 1858, em seu livro *Cellular Pathologie* (MEDZHITOV, 2010).

Os eventos inflamatórios podem ser divididos em padrões agudo e crônico. A inflamação é considerada aguda por possuir duração relativamente curta e ser auto limitada podendo durar minutos, horas ou alguns dias, e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido plasmático rico em proteínas e migração de células para o local da lesão. Já a inflamação crônica apresenta maior tempo de duração e estar histologicamente associada à presença de linfócitos e de macrófagos, angiogênese (proliferação de vasos sanguíneos), fibrose e necrose tecidual (TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação aguda tem um papel fisiológico importante na defesa do hospedeiro e reparação dos tecidos, mas quando esse processo é exacerbado pode levar à lesão tecidual excessiva e evoluir para um processo crônico, podendo ocasionar câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, pulmonares e neurológicas. Para que isto não ocorra, é necessário limitar o processo inflamatório pela eliminação do infiltrado celular e de seus produtos potencialmente tóxicos. Uma grande variedade de eventos, incluindo danos mecânicos, infecções, lesões químicas, queimaduras, radiação e injúria tecidual, podem induzir a inflamação aguda (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

O processo inflamatório agudo é iniciado a partir da ativação de células teciduais (macrófagos) e migratórias (neutrófilos). Células fagocíticas incluindo macrófagos teciduais, neutrófilos e monócitos circulantes desenvolvem importante papel na resposta inflamatória aguda. Estas células respondem aos chamados mediadores pró-inflamatórios (MATZINGER, 1994) gerados no local da infecção tais como, o Fator de Necrose Tumoral (TNF α), a Interleucina-1

(IL1 β), prostaglandinas (PGs), cininas e componentes intracelulares, como o ATP (trifosfato de adenosina), peptídeos contendo N-formil-metionina liberados por bactérias, proteínas do sistema de coagulação, produtos do complemento, e outras citocinas, tais como interferon- γ , IL-6, IL-12 e IL-17 liberadas dos macrófagos tissulares. Conceitualmente, os sinais de perigo são moléculas ou estruturas moleculares liberadas ou produzidas por células sob estresse e que são reconhecidas por células, resultando no desencadeamento da resposta imune (MATZINGER, 2001).

Os mediadores liberados na inflamação atuam localmente e/ou sistematicamente colaborando para o aparecimento dos sinais cardinais característicos desse processo, ou seja, dor, calor, rubor e tumor, acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA e SILVA, 1994).

Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam restringindo as consequências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais cardinais localmente. Entretanto, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticoides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como ferro, cobre e zinco. Esta resposta sistêmica é denominada reação de fase aguda e nessas situações pode-se observar que o sistema nervoso central e imune estão funcionalmente conectados e integrados (STADNYK e GAULDIE, 1991).

1.2. Inflamação Aguda

O conjunto de células que migram para o sítio inflamatório durante o processo inicial da inflamação é constituído principalmente de neutrófilos e de monócitos/macrófagos (INGERSOLL et al., 2011)

Os neutrófilos, em humanos, constituem cerca de 50-70 % dos leucócitos no sangue periférico e circulam por cerca de 10 horas e depois morrem. Eles patrulham os vasos sanguíneos e, na presença dos sinais inflamatórios, os neutrófilos deixam de circular e migram para os tecidos inflamados pelo processo de diapedese, sendo as primeiras células a extravasarem para os sítios inflamatórios (CHOI et al., 2009). Os neutrófilos, juntamente com eosinófilos e basófilos, pertencem ao grupo de leucócitos denominados granulócitos, uma vez que contêm grânulos intracelulares. Os neutrófilos são também chamados de polimorfonucleares (PMN), devido ao seu núcleo segmentado ser dividido em vários lóbulos (PORTH, 2010).

A migração e acúmulo contínuo de neutrófilos nos tecidos é uma característica de condições inflamatórias agudas e crônicas, tais como glomerulonefrite, doença inflamatória intestinal, vasculite autoimune, dermatite e artrite reumatoide (LARSEN et al., 2009).

Os monócitos ao chegarem aos tecidos extravasculares se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas, por isso, estas células são comumente denominadas derivadas de monócitos (GEISSMANN et al., 2010). A diferenciação dos monócitos em macrófagos é influenciada por eventos de adesão durante o extravasamento e por mediadores presentes no local inflamado (SUDHAKARAN et al., 2007).

Os monócitos, em humanos, por sua vez se apresentam em menor proporção correspondendo de 5 a 10 % dos leucócitos periféricos circulantes. Estas células se desenvolvem na medula óssea, circulam no sangue periférico e migram para o tecido inflamado mediante a presença de estímulos tais como a citocina proteína-1 quimiotática do monócito (MCP-1) (CHOI et al., 2009).

No processo inflamatório, os macrófagos possuem três funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação por meio da produção de várias citocinas e fatores de crescimento, desempenhando papéis fundamentais na iniciação, manutenção e resolução do processo inflamatório como a fagocitose de restos celulares e proteicos somados à secreção de citocinas como o TGF- β que estimula a proliferação de fibroblastos (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

A inflamação, portanto, tem como função proteger uma região definida do tecido infectado ou danificado para inibir a progressão da lesão, isolando a área e evitando a disseminação do agente infectante ou de produtos celulares tóxicos aos tecidos e, uma vez a inflamação sendo resolvida, a função tecidual é restaurada ao normal. Contudo, se caso o agente infeccioso ou os produtos celulares continuem presentes desenvolver-se-á uma inflamação crônica (MONTELEONE, 2011).

1.3. Mediadores Inflamatórios

Uma variedade de mediadores reconhecidos por exercerem papéis importantes no processo inflamatório são liberados a partir de diferentes fontes como leucócitos, plaquetas e endotélio, liberados a partir do metabolismo do ácido araquidônico como PGs e leucotrienos (LTs). Os mediadores podem ser considerados de ação rápida como as aminas vasoativas (histamina e serotonina) e as cininas ou de ação prolongada, como as citocinas (GONZALEZ-REY et al., 2007).

As aminas vasoativas são substâncias hidrossolúveis que contêm grupamentos amino em sua estrutura, como a histamina e serotonina, e agem sobre os vasos sanguíneos para alterar a sua permeabilidade ou para causar vasodilatação (BRAND et al., 2002).

A histamina é responsável por inúmeras respostas celulares, incluindo o estímulo a secreção do ácido gástrico, neurotransmissão, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular no início das reações alérgicas e inflamatórias, (JONES e KEARNS, 2011).

Os efeitos dos mediadores hidrossolúveis liberados durante a inflamação somam-se aos das substâncias lipossolúveis denominadas prostanóides provenientes do metabolismo do ácido araquidônico (AA), tais como PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂, prostaciclina e tromboxanos que apresentam suas biossínteses significativamente aumentadas nos tecidos inflamados (NARUMIYA, 2009).

A PGE₂ é formada a partir do AA por ação das COXs que catalisam a síntese de PGH₂, para posteriormente ser transformada em PGE₂ pela ação da PGE₂ sintase (PGES) (SAMUELSSON et al., 2007). Existem pelo menos três isoformas de PGES humanas clonadas e caracterizadas, como duas PGES associadas à membrana, chamada PGE sintase-1 microssomal (mPGES-1, mPGES-2), e uma PGES citosólica (cPGES) (KAWABATA, 2011).

As cininas constituem peptídeos formados no plasma e em tecidos periféricos em resposta a ativação de enzimas denominadas calicreínas, atuando em substratos denominados de cininogênios. As cininas atuam em diferentes mecanismos fisiológicos, incluindo o controle da pressão arterial, da contração ou do relaxamento de músculo liso, da permeabilidade vascular e da transmissão da dor (FERREIRA et al., 2002).

Em mamíferos foram identificadas três cininas importantes: bradicinina (BK), Lys-bradicinina e des-Arg⁹-bradicinina (MARCEAU e REGOLI, 2004). Os efeitos da BK (nonapeptídeo) no processo inflamatório dependem da sua interação com os subtipos de receptores B₁ e/ou B₂ (MARCEAU e REGOLI, 2004). Os receptores B₁ são escassamente expressos em tecidos saudáveis, mas sua expressão pode ser aumentada pela injúria e infecção. (EHRENFELD et al., 2006)

Essas substâncias em sinergismo ampliam e intensificam a resposta inflamatória contribuindo assim para a efetividade da resposta e a destruição do estímulo inflamatório.

1.4. O Uso de Plantas Medicinais

O uso de espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças se perpetuou na história da civilização até a atualidade, sendo amplamente utilizado por grande parte da população mundial. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial já usou algum tipo de erva, na busca de alívio de alguma sintomatologia desagradável (QUINTAS, 2008).

A utilização de plantas com fins medicinais, conhecida atualmente como fitoterapia, durante vários séculos constituiu a base terapêutica da prática médica. A partir do século XIX, com o progresso da química, as moléculas ativas foram extraídas das plantas e reproduzidas artificialmente, o que, somado ao desenvolvimento da indústria farmacêutica, levou a maioria da população a substituir progressivamente as plantas *in natura* pelas drogas, não por ineficiência das primeiras, mas, principalmente, pela maior oferta dos medicamentos sintéticos que, pela comodidade, foram mais aceitos pelas populações, principalmente dos centros urbanos maiores (SCHMOURLO et al., 2005).

O emprego de plantas na medicina popular é uma prática bastante realizada e para o tratamento de enfermidades. Apesar do surgimento dos medicamentos sintéticos, os estudos de plantas medicinais continuam sendo extensivamente explorados, tendo em vista a grande biodiversidade em todo nosso planeta, em especial os países tropicais (GILANI e ATTA UR, 2005).

Muitas plantas, cuja indicação popular atuam na inflamação, são alvos para o estudo de novas terapêuticas para esta área. O uso popular, como também novas ações terapêuticas são muitas vezes confirmados pelos resultados das pesquisas científicas.

1.5. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae)

A planta *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) (Figura 1) é endêmica no nordeste brasileiro (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997) apresentando os nomes populares de milona, abuteira ou orelha de onça. As suas raízes são utilizadas, em forma de maceração, pela medicina popular para o tratamento de diarreias, doenças do trato geniturinário e doenças do trato respiratório tais como: asma, influenza e bronquite (CORRÊA, 1984).



Figura 1 - Folhas da planta *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae).

Ensaio farmacológico demonstraram que o extrato hidroalcoólico das raízes de *Cissampelos sympodialis* (AFR- *alcoholic fraction from roots*) apresentou ação espasmolítica na musculatura lisa de traqueia de cobaias sensibilizados com ovalbumina (OVA) (THOMAS et al., 1995). Contudo para a produção do AFR se faz necessária a destruição da planta, o que limita os estudos e a possível produção de um medicamento fitoterápico. A alternativa para transpor tal barreira foi realizar os estudos com o extrato hidroalcoólico de suas folhas (AFL- *alcoholic fraction from leaves*), os quais demonstraram atividade espasmolítica na musculatura lisa de traqueia de cobaias semelhante a do AFR (THOMAS et al., 1997a)

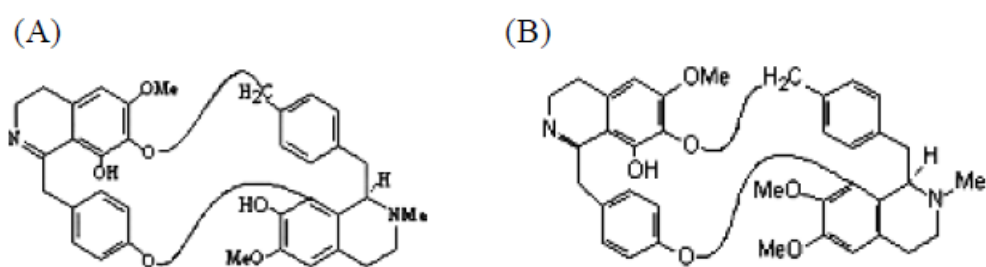
Posteriormente, foi demonstrado que o AFL inibiu a resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos BALB/c (PIUVEZAM et al., 1999; ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003a), a proliferação de linfócito B e a produção de IgM, quando as células foram estimuladas com LPS bacteriano ou com Ig-anti-IgM (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003b), demonstrando que o extrato das folhas da planta interfere na atividade imunológica e que tem potencial contra doenças relacionadas, estimulando a continuidade da pesquisa.

A atividade anti-inflamatória do AFL foi inicialmente demonstrada utilizando o método clássico de edema de orelha induzido por mediadores farmacológicos tais com capsaicina ou acetato de tetradecanoilforbol (BATISTA-LIMA et al., 2001).

Bezerra-Santos e colaboradores (2004) demonstraram que AFL quando administrado por via oral (v.o.) inibiu a produção de imunoglobulina E (IgE OVA-específica) em modelo experimental de asma, possivelmente por um mecanismo que envolveu a produção de IFN- γ e da citocina reguladora IL-10, ambas produzidas por linfócitos T (PIUVEZAM et al., 1999). O AFL também inibiu o recrutamento de leucócitos inflamatórios para o lavado bronco alveolar e tecido pulmonar induzido por antígenos (ovalbumina ou extrato de ácaro *Blomia tropicalis*) e o remodelamento pulmonar associado à inflamação crônica (BEZERRA-SANTOS et al., 2006; CERQUEIRA-LIMA et al., 2010; BEZERRA-SANTOS et al., 2012).

Vieira e col. (2013) demonstraram que o AFL administrado pela via inalatória foi capaz de reduzir a migração específica de células da inflamação para o lavado bronco alveolar e reduzir a produção de muco e de fibras associadas ao remodelamento tecidual pulmonar presente na inflamação crônica induzida por alérgeno.

Em paralelo aos estudos na área de imunofarmacologia foram realizados estudos fitoquímicos que resultaram no isolamento, identificação e caracterização dos compostos dos extratos de *Cissampelos sympodialis*. Dentre eles estão os alcaloides bisbenzilisquinolínicos - warifteina e metil-warifteina (Figuras 2A e 2B respectivamente), o alcalóide morfinânico - milonina e o alcalóide aporfínico- laurifolina (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997). O alcaloide roraimina, do tipo bisbenzilisquinolínico, foi isolado posteriormente (DE LIRA et al., 2002) demonstrando que a maior parte de metabólitos secundários presentes nos extratos de *C. sympodialis* são representados por alcaloides.



Fonte: PIUVEZAM et al., 2012.

Figura 2 – Estrutura química da warifteina (A) e da metil-warifteina (B)

A warifteina (W) é um alcaloide do tipo bisbenzilisquinolínico com peso molecular igual a 592 u, possuindo em sua molécula uma ponte metilênica, que é uma característica pouco comum às substâncias desta classe (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997). A warifteina foi o alcaloide isolado e encontrado em maior proporção nos extratos hidroalcoólicos das raízes e das folhas da planta *Cissampelos sympodialis* (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997;

MARINHO et al., 2012) o que vem justificar a sua escolha como um marcador molecular, pré-requisito para a produção de um fitoterápico a partir de um extrato padronizado (MARINHO, 2012; RESOLUÇÃO-RDC Nº- 48, DE 14 DE MARÇO DE 2004).

A warifteina demonstrou ter ampla atividade farmacológica, dentre elas: bloqueadora neuromuscular (GORINSKY et al. 1972); relaxante de músculos lisos de íleos de cobaias (CÔRTEZ et al., 1995) e ação espasmolítica em músculo liso de aorta de coelho por modificação do metabolismo do cálcio (Ca^{++}) (FREITAS et al., 1996). A warifteina também foi capaz de aumentar os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) em cultura de músculo liso de cobaia pela inibição da atividade enzimática da fosfodiesterase IV e V (THOMAS et al., 1997b).

Ensaios de toxicidade aguda da warifteina em camundongos demonstraram que a dose letal para 50% (DL_{50}) dos animais é de 511 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.). Entretanto, por via oral (v.o.), doses até 1000 mg/kg não induziram mortalidade nos animais durante o tempo de avaliação (CÔRTEZ, 1992). As avaliações de citotoxicidade de warifteina em culturas de hepatócitos e fibroblastos mostraram que a concentração inibitória de 50% das células (CI_{50}) varia de 10 a 35 μM de acordo com a metodologia empregada (MELO et al. 2003).

Estudos em modelo de alergia experimental demonstraram que o tratamento com warifteina (v.o.) reduziu a eosinofilia provocada pelo antígeno na pleura e no lavado bronco-alveolar (BAL) de animais sensibilizados com OVA, assim como reduziu os níveis pleurais de cistenil-leucotrienos e a inflamação alérgica pulmonar (BEZERRA-SANTOS et al., 2006).

Em estudo posterior, foi observado que o tratamento com warifteina, inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia induzida por IgE, na presença de antígeno ou por mediadores fisiológicos, inibiu a produção de IgE total e de IgE antígeno-específica e ainda reduziu a formação de edema de pata pelo mecanismo dependente da produção de IgE, assim como inibiu a desgranulação de mastócitos e a proliferação de esplenócitos *in vitro* (COSTA et al., 2008). No entanto, a warifteina induziu a produção de óxido nítrico (NO) de macrófagos peritoneais (COSTA et al., 2008) demonstrando estimular um perfil de resposta imunológica inibitória ao desenvolvimento da resposta imune alérgica.

A warifteina exibiu similaridades aos efeitos demonstrados com a fração de alcaloides da folha (AFL), Rocha e colaboradores (2010) demonstram que a warifteina age diretamente na função dos linfócitos B inibindo a proliferação e secreção de Ig, modificando o padrão de fosforilação de tirosina cinase ativada por mitógeno ERK e os níveis intranucleares de NF κ B. Associado à inibição da atividade dos sinalizadores intracelulares, a warifteina promove o aumento de AMPc em linfócitos B e em homogenato de musculo liso.

A metil-warifteina, um derivado natural da warifteina induziu aumento nos níveis de AMPc em homogenato de músculo liso com potência superior à warifteina (THOMAS et al., 1997b), contudo a menor quantidade deste alcaloide nos extratos limitou as pesquisas anteriores. Em adição a metil-warifteina reduziu o número de linfócitos T no BAL sugerindo que a planta com seus compostos estejam regulando esta população de células (VIEIRA et al. 2013).

Por fim, warifteina e metil-warifteina também modulam a resposta imune em camundongos BALB/c com alergia alimentar. (Costa, 2013)

De acordo com o exposto acima em que o extrato das folhas da planta *C. sympodialis* tem apresentado efeitos anti-inflamatório e antialérgico em modelos clássicos de inflamação (BATISTA-LIMA et al. 2001) e de alergia pulmonar (BEZERRA-SANTOS et al. 2006, 2012) e ainda relatos de que macerados de partes da planta são utilizados na medicina popular para o tratamento de inflamações e diarreias.

OBJETIVOS

2. *Objetivos*

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiinflamatória dos alcalóides warifteína e metil-warifteína de *Cissampelos sympodialis* ECHL (menispermaceae) em camundongos *swiss*.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar o efeito dos alcalóides na formação do edema de pata;
- 2.2.2 Avaliar o efeito dos alcalóides no processo inflamatório par ao peritônio;
- 2.2.3 Avaliar o efeito dos alcalóides na permeabilidade vascular.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Camundongas fêmeas Swiss, fornecido pelo biotério Prof. Dr. Thomas George no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da Universidade Federal da Paraíba, Brasil foram utilizadas. Os animais tiveram livre acesso à água e alimentação balanceadas a base de ração tipo Pellets, numa temperatura média de $21\pm1^{\circ}\text{C}$, pesando entre 20 – 25kg. Aprovado pelo comitê de ética em uso animal sob o número CEUA N° 0411/12.

3.2. Preparo da solução do alcaloide

Os alcalóides foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho. As soluções desses alcalóides foram preparadas dissolvendo-se 1 mg do material em 50 μL de HCl 1N e em seguida adicionando-se 800 μL de solução salina (NaCl 0,9%). O pH foi ajustado para 7 com uma solução de hidróxido de sódio 1M e o volume completado para 1000 μL .

3.3. Tratamento dos animais

Grupos de animais ($n= 4 - 6$) foram tratados por via oral (v.o) com warifteína ou metil warifteína (2,0 ou 10 mg/kg), droga-padrão (indometacina ,10 mg/kg, via oral (v.o); ou veículo (grupo controle positivo) 1 hora antes do desafio com o agente flogístico. O grupo salina (grupo controle negativo) correspondeu aos animais que receberam salina sem serem desafiados com o agente flogístico.

3.4. Edema de pata induzido por agentes flogísticos

Esta abordagem experimental baseia-se no fato de que a administração de agentes flogísticos na pata de um animal, produz uma reação inflamatória local caracterizada pela formação de edema, reprodutível e facilmente mensurável. Os agentes flogísticos são compostos que induzem um processo inflamatório no tecido com os quatro sinais cardinais devidamente representados. Antes da realização dos experimentos, a espessura das patas traseiras dos camundongos foram medidas com um paquímetro digital (GREAT, MT – 04513) e a diferença entre a pata direita e esquerda foram consideradas como a medida basal. Uma hora após os tratamentos (warifteína, metil warifteína ou indometacina), os camundongos foram desafiados pela administração intraplantar com 20 μL de soluções contendo carragenina (500 μg /pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA), PGE_2 (5 nmol/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA) ou

bradicinina (3 nmol/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA) na pata esquerda e com 20 µL de salina na pata direita. A diferença entre a espessura da pata traseira direita e esquerda foi avaliada nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a aplicação da carragenina;. Os edemas induzidos pela prostaglandina E2 (PGE₂) mensurados nos tempos de 15, 30 e 60 minutos e bradicinina foram mensurados em 15 e 30 minutos após a aplicação desses agentes flogísticos. Os edemas foram calculados pela diferença obtida entre o diâmetro da pata esquerda e direita nos tempos indicados usando novamente o paquímetro digital (NAIDU et al., 2010).

3.5. Avaliação da permeabilidade vascular

Este teste baseia-se no fato de que a administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético a 0,6% provoca reação inflamatória local envolvendo a liberação de mediadores que induzem o aumento da permeabilidade vascular levando ao extravasamento de líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício, que pode ser quantificada por meio de corantes específicos. O azul de Evans tem sido amplamente utilizado em diversos trabalhos experimentais, devido apresentar características como inocuidade, alta solubilidade em água e afinidade pela albumina. O azul de Evans se combina à albumina plasmática formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada, sendo então quantificados por métodos colorimétricos. Para este experimento, utilizou-se 7 grupos de camundongos que foram tratados previamente com indometacina (10 mg/kg, v.o), warifteína ou metil warifteína (2,0 ou 10 mg/kg, v.o) ou e grupo controles, tratados com salina, (n=6). (v.o) e, uma hora após esses tratamentos, os animais receberam o ácido acético (300µL a 0,6%) intraperitonealmente. Uma solução contendo azul de Evans (1% -intravenosa) foi injetada 10-20 min antes da inoculação do ácido acético. Vinte minutos após o desafio com ácido acético os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram posteriormente os peritônios lavados com 10 mL de água destilada. Após esse procedimento as amostras obtidas dos peritônios foram transferidas para tubos do tipo falcon. As soluções foram centrifugadas (CR422, JONAM) por 10min/1500 rpm/8 °C e transferidas para placas de 96 poços (NUNC-Immuno™), para posteriormente serem analisadas com comprimento de onda de 620 nm, utilizando o espectrofotômetro (ELx808 Absorbance Microplate Reader) (KOU et al., 2005).

3.6. Migração celular para o peritônio induzido por *zimosan*

O modelo de inflamação peritoneal induzida por *zimosan* permite analisar a migração celular no sítio inflamatório, bem como a produção e liberação de mediadores da inflamação no fluido peritoneal.

Para esse experimento camundongos foram divididos em 7 grupos warifteína ou metil

warifteína (2,0 ou 10 mg/kg v.o.), indometacina (10mg /kg, v.o.) e grupo controles, tratados com salina, (n=6). Para a indução da peritonite os camundongos receberam por via intraperitoneal (i.p) a administração de uma solução de 1 ml de uma suspensão de zimosan (1mg/mL de PBS) por via intraperitoneal. As células do exsudato peritoneal foram colhidas após 4 horas, com 5 mL de PBS (SHIN, 2007).

3.7. Contagem de células do lavado peritoneal

A contagem total das células no lavado peritoneal foi realizada utilizando a câmara de Neubauer. Antes da montagem da câmara para a contagem das células ao microscópio, as amostras foram diluídas em solução de Turk. Para contagem diferencial, lâminas de microscopia foram montadas e centrifugadas em citocentrífuga (Citospin - FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400), para tal, 100µL da suspensão de células de cada amostra foi inserida nos seus respectivos orifícios das lâminas de citospin e então centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm. As células foram coradas com a coloração de May-Gruanwald-Giemsa e a contagem diferencial foi realizada com objetiva de imersão (1000X aumento final). A contagem diferencial foi realizada usando o padrão de critérios morfológicos para identificar os tipos de células (Sousa et al., 2010).

3.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste t-Student utilizando o programa GraphPadPrism, versão 5.0 (Graphpad Oftware Inc., San Diego, USA), empregando-se o teste T-student, onde os valores de $P < 0,05$, $P < 0,01$ ou $P < 0,001$ foram considerados significativos.

3.9. Substâncias e sais

1. Ácido Acético Glacial ($C_2H_4O_2$) –VETEC
2. Álcool Metílico (CH_3OH) - VETEC
3. Cloreto de potássio (KCl) – MERK
4. Cloreto de sódio (NaCl) – SIGMA
5. Corante eosina azul de metileno segundo Giemsa – VETEC
6. Corante eosina azul de metileno segundo May- Grunwald – VETEC
7. Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) – MERCK
8. Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) - MERCK
9. Formaldeído – MERCK

3.10. Soluções

Tabela 1. Solução de Turk

<i>Substância</i>	<i>Quantidade</i>
Ácido Acético Glacial	1,5 mL
Violeta de Genciana 1%	1,0 mL
Água destilada q.s.p.	100,0 mL

Tabela 2. Salina

<i>Substância</i>	<i>Quantidade</i>
NaCl (Cloreto de sódio)	9 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Tabela 3. Solução salina tamponada (PBS)

<i>Substância</i>	<i>Quantidade</i>
Cloreto de sódio	8,76 g
Fosfato de Sódio dibásico	2,249 g
Fosfato de Sódio monobásico	0,255 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Tabela 4. Tampão Fosfato pH 7,2 utilizado no corante May-Grunwald-Giemsa

<i>Substância</i>	<i>Quantidade</i>
Solução A	71,5 mL
Solução B	28,5 mL
Solução A	
Na ₂ PO ₄ anidro	9,47 g
Água destilada	1000 mL
Solução B	
KH ₂ PO ₄ anidro	9,08 g
Água destilada	1000 mL

Tabela 5. Corante May-Grunwald

<i>Substância</i>	<i>Quantidade</i>
Corante de May- Grunwald	0,3 g
Álcool Metílico Absoluto	100 mL

O corante foi dissolvido em álcool e deixado em repouso por 2 a 3 dias. Antes de usar, foi filtrado e misturado em igual volume do tampão fosfato pH 7,2.

Tabela 6. Corante Giemsa

<i>Substância</i>	<i>Quantidade</i>
Corante Giemsa em pó	0,6 g
Álcool Metílico Absoluto	100 mL

3.11. Aparelhos

1. Agitador Vortex - VWR – Scientific Products
2. Balança analítica – Satorius
3. Centrífuga refrigerada – Centra MP4R – International Equipement Company (IEC)
4. Cytospin – FANEM
5. Microscópio óptico – Nikon

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Efeito da warifteína e metil-warifteína no edema de pata induzido por carragenina.

O tratamento por via oral com a warifteína nas doses de 2,0 e 10,0 mg/kg 1 h antes do desafio com a carragenina (500 µg/pata) inibiu o edema de pata quando comparado ao grupo controle positivo (CTR+). O efeito foi mais pronunciado nos tempo de 6 e 24 horas, não havendo diferença estatística entre as concentrações do alcaloide warifteína (Gráfico 1A). O efeito observado com o alcaloide warifteína foi semelhante àquele observado com a droga padrão indometacina. Entretanto como esperado o grupo controle negativo (CTR-) não apresentou edema de pata.

Contudo, o alcaloide metil-warifteína apresentou efeito antiedematogênico, com ambas as doses apenas no tempo de 3 h, e também observado em 24 h apenas na dose de 10 mg/kg (Gráfico 1B) demonstrando que a metil-warifteína é menos potente que a warifteína em modelo de edema induzido por carragenina.

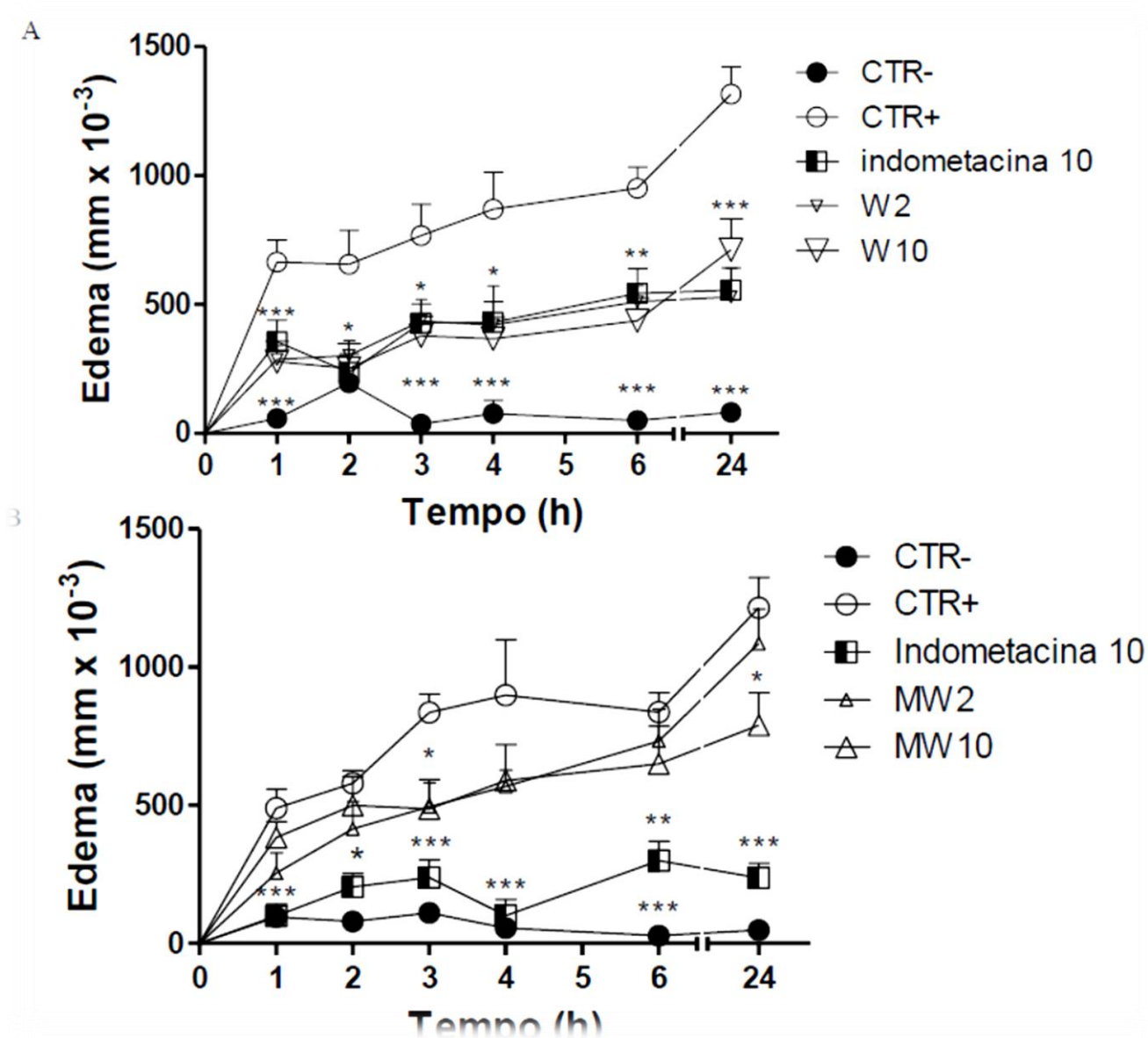


Gráfico 1. Efeito da warifteina ou metil-warifteina na formação do edema de pata em camundongos Swiss desafiados com carragenina. Camundongos foram tratados com a warifteina (A) ou metil-warifteina (B) nas doses de 2mg/kg (W2, MW2) ou 10 mg/kg (W10, MW10), indometacina 10 mg/kg (indometacina 10), ou salina (CTR+) e após 1 h, receberam a injeção intraplantar de carragenina (500 µg/pata) (A e B) na pata direita e salina na pata esquerda. A formação do edema foi quantificado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a administração da carragenina (A e B). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo CTR+ e, +++ $p < 0,001$ comparados ao grupo CTR-, ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

4.2. Efeito da warifteína e da metil-warifteína no edema de pata induzido por mediadores da inflamação, prostaglandina E2 (PGE2) ou bradicinina.

O gráfico 2C mostra que o tratamento oral com a warifteína na dose de 10 mg/kg administrada 1 h antes da inoculação da PGE2 inibiu significativamente o edema de pata nos tempos de 15 e 30 min reduzindo respectivamente em 36 e 28 % no diâmetro da pata em comparação ao CTR+. Resultado semelhante foi observado com a droga padrão indometacina. Entretanto, a dose de 2 mg/kg de warifteína inibiu o edema de pata apenas no tempo de 30 min. com a porcentagem de inibição em torno de 37 % em relação ao CTR+. O tratamento com metil-warifteína (2 e 10 mg/kg) não inibiu o edema induzido por PGE2 nos tempos avaliados (Gráfico 2D) confirmando os resultados observados no edema induzido por carragenina.

No edema de pata induzido com a bradicinina os tratamentos com warifteína e metil-warifteína não inibiram o edema nos tempos avaliados (Gráficos 2 E e F) apenas a indometacina, no tempo de 30min, reduziu o edema provocado por este mediador da inflamação comparado ao grupo CTR+.

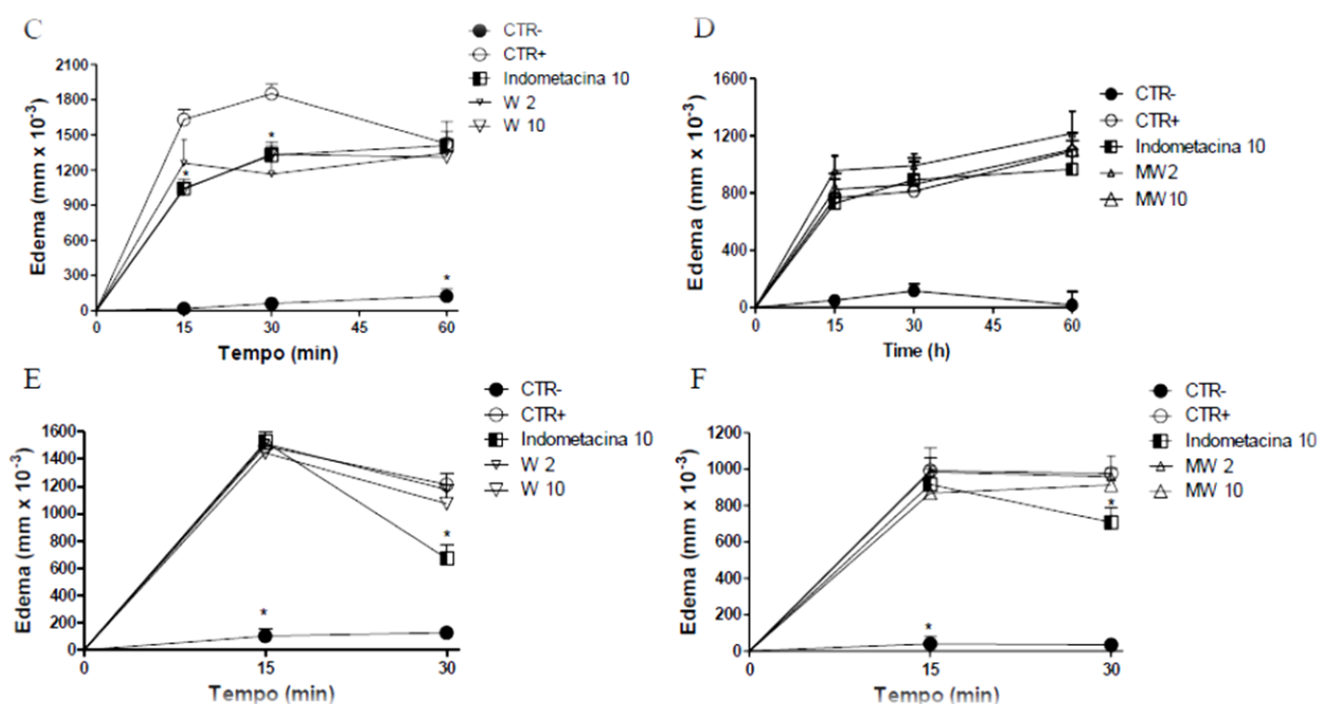


Gráfico 2. . Efeito da warifteína e metil-warifteína na formação do edema de pata em camundongos Swiss desafiados com PGE2 ou Bradicinina. Camundongos foram tratados com a warifteína ou metil-warifteína nas doses de 2mg/kg (W2 ou MW2) ou 10 mg/kg (W10 ou MW10), indometacina 10 mg/kg (indometacina 10), ou salina (CTR+) e após 1 h, receberam injeções intraplantar de PGE2 (5 nmol) (C e D) ou bradicinina (3 nmol) (E e F) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle negativo (CTR-) recebeu injeção de salina em ambas as patas. A formação do edema foi quantificado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda de acordo como os tempos indicados nos gráficos. Os

resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo CTR+. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

4.3. Efeito da warifteína e metil-warifteína na permeabilidade vascular induzida por ácido acético.

O gráfico 3A apresenta os resultados do tratamento de camundongos com a warifteína (2 ou 10 mg/kg) no extravasamento de proteínas para o peritônio induzido por ácido acético. O tratamento reduziu significativamente, o extravasamento de proteínas plasmáticas para o peritônio quando comparada com o grupo de animais tratados com salina (CTR+). Esse efeito inibitório foi da ordem de 58 % para o grupo W (2mg/kg) e 62 % para o grupo W (10mg/kg). Comparando-se a menor dose testada das duas moléculas observamos que a metil-warifteína apresentou efeito mais pronunciado que a warifteína neste modelo ($p < 0,05$) (Gráfico 3B). O grupo indometacina apresentou inibição na ordem de 80 %, não havendo diferença entre os grupos W (2mg/kg) e W (10mg/kg) (Gráfico 3A).

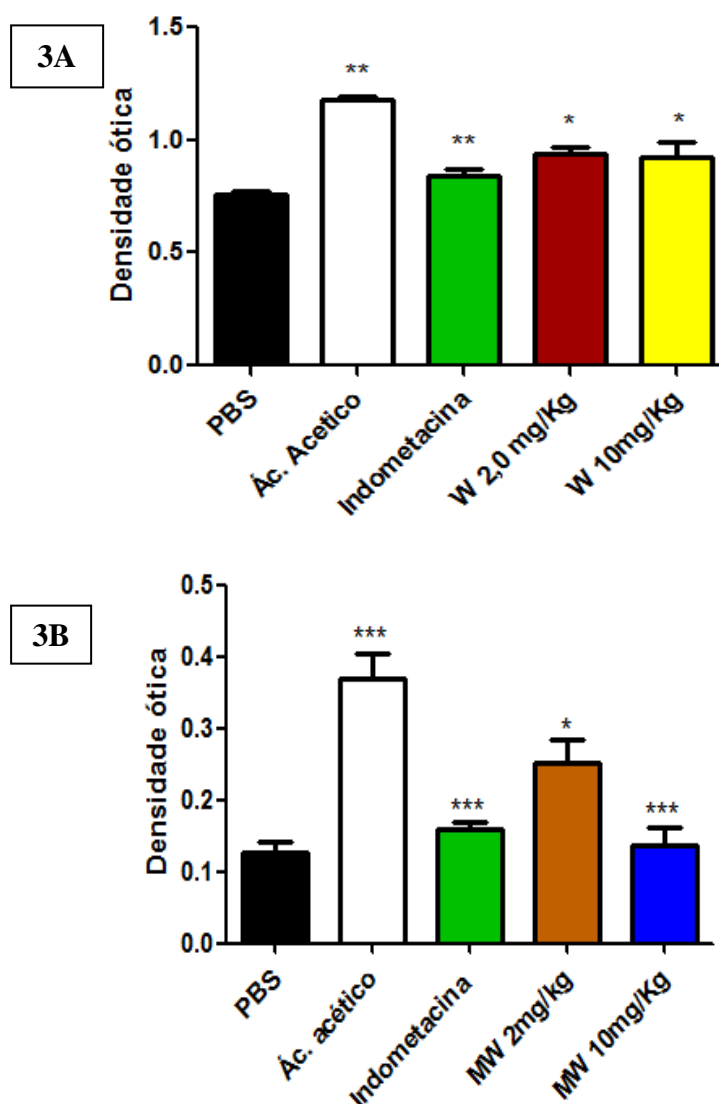


Gráfico 3. Efeito da warifteína e metil-warifteína no extravasamento de líquido para o peritônio de camundongos Swiss desafiados com ácido acético. Camundongos swiss foram

tratados com a warifteína e metil-warifteína na dose de 2mg/kg (W2, MW2) (A e B) ou warifteína na dose de 10 mg/kg (W10) (A), indometacina 10 mg/kg (indometacina 10), ou salina (CTR+) 1 h antes de uma injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6% em salina). O efeito foi avaliado pelo extravasamento do corante azul de Evans, para a cavidade peritoneal dos camundongos, 1 hora após o desafio com ácido acético. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=4-6). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo CTR+, ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,01$ quando comparados ao grupo CTR-. ANOVA “one-way” seguido do teste de Tukey.

4.4. Efeito da warifteina e metil-warifteina na migração de células inflamatórias induzida por zimosan.

A migração de neutrófilos e macrófagos é essencial para a gênese e manutenção da inflamação, contudo os tratamentos com warifteína ou metil-warifteína (2 ou 10mg/kg) não inibiram a migração celular para o peritônio (Gráfico 4). A indometacina mostrou redução da migração de células apresentando níveis basais de células presentes no peritônio semelhantes àqueles observados no grupo CTR-.

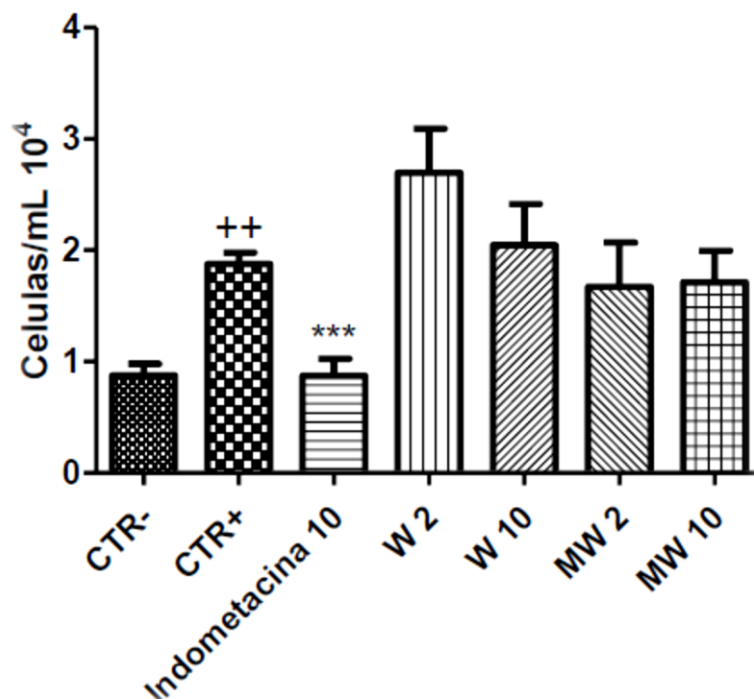


Gráfico 4. Efeito da warifteina e metil-warifteina na migração de células da inflamação para o peritônio de camundongos Swiss desafiados com zimosan. Camundongos Swiss foram tratados com a warifteina ou metil-warifteina nas doses de 2mg/kg (W2 ou MW2) ou 10 mg/kg (W10 ou MW10), indometacina 10 mg/kg (indometacina 10), ou salina (CTR+) 1 h antes de uma injeção intraperitoneal contendo uma suspensão de zimosan (1mg/mL em salina). O efeito foi avaliado pela contagem total de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal dos camundongos, 4 horas após a administração de zimosan. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=4-6). * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo CTR+, ANOVA “one-way” seguido do teste de Tukey.

DISCUSSÃO

5. *Discussão*

O processo inflamatório compreende, no mínimo, dois processos antagônicos: a resolução do processo inflamatório no sítio inflamado e, portanto homeostasia ou a não resolução do processo e, portanto, destruição do tecido no sítio inflamado. No primeiro caso ocorre a denominada inflamação aguda que é um processo celular e molecular do sistema imune de defesa do organismo a uma agressão ao tecido que pode levar até sete dias, mas no final o tecido inflamado se recupera e no segundo caso ocorre a denominada inflamação crônica que também é um processo celular e molecular do sistema de defesa a uma agressão ao tecido, mas que não leva à recuperação e sim à permanência do processo com destruição do tecido (TOUSSIROT, 2012).

Dentre os principais fármacos utilizados na clínica para os processos inflamatórios encontram-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) com aplicação ampla e os esteroidais com aplicações mais restritas devido aos graves efeitos adversos. Os AINEs, em sua maioria, agem inibindo a atividade da COX-1 e/ou COX-2, inibindo assim, a síntese de prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) (BURIAN e GEISLINGER, 2005). O ácido acetilsalicílico (AAS), extraído em 1828 das cascas do salgueiro (*Salix alba*) é o protótipo da classe e é capaz de acetilar irreversivelmente a COX (AMANN e PESKAR, 2002). Além do AAS, outros fármacos como o ibuprofeno, derivado do ácido propiônico e o piroxicam, são considerados anti-inflamatórios não-esteroidais. Todos estes derivados de ácidos competem com o ácido araquidônico pelo local ativo da COX (WIDLANSKY, et al., 2003). Embora os AINEs sejam os medicamentos mais comumente usados nas doenças inflamatórias, causam sérios efeitos adversos no trato gastrointestinal, além de falência renal e asma. (VANE e BOTTING, 1998).

Os glicocorticoides, anti-inflamatórios esteroidais, são mediadores anti-inflamatórios endógenos potentes, liberados em minutos em resposta ao estresse e à lesão tecidual para controlar a severidade da resposta inflamatória. Fármacos glicocorticoides sintéticos agem da mesma forma que mediadores endógenos, através de receptores intracelulares (GR) ativados pelo complexo glicocorticoide-GR que migram para o núcleo e interagem com elementos responsivos aos glicocorticoides (GRE). Esta ligação leva à ativação ou à inibição da transcrição de genes alvo, modulando a resposta inflamatória de maneira efetiva e duradoura. (GILROY et al., 2004;). Apesar da eficácia dos corticoides em controlar quadros inflamatórios graves, a aplicação clínica dos glicocorticoides deve ser cuidadosa e limitada a curtos períodos de tempo, uma vez que os efeitos colaterais destes,

principalmente quando da utilização sistêmica, incluem a supressão da liberação do cortisol (principal glicocorticoide endógeno) pelas glândulas adrenais e como efeitos adversos temos distúrbios cardiovascular, crises de psicose, câncer e osteoporose (STROHMAYER e KRAKOFF, 2011.).

Levando em consideração que as drogas comumente utilizadas nos processos inflamatórios apresentam graves efeitos adversos e isto tem impulsionado a busca por novos fármacos, nosso grupo de pesquisa tem sistematicamente estudado extratos e compostos derivados de plantas no sentido de descobrir novos protótipos de moléculas com efeitos anti-inflamatórios. Nesse sentido a planta *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae), comumente utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamações do trato respiratório e gastrointestinal, vem sendo estudada e o extrato hidroalcoólico das folhas e o alcalóide warifteína apresentaram efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos em modelos experimentais (BEZERRA-SANTOS et al. 2012).

A inflamação aguda experimental pode ser obtida pela administração subcutânea de agentes flogísticos como a carragenina, o lipopolissacarídeo (LPS), o zimosan ou ainda mediadores da inflamação como as PGs, a histamina ou a bradicininas em camundongos promovendo uma reação inflamatória localizada levando ao inchaço (edema) do local pelo imediato extravasamento de líquido e proteínas dos vasos e posterior migração de leucócitos para o tecido. Entretanto, cada modelo desses apresenta modos de ação diferenciados na indução de inflamação sendo, portanto, considerados eficazes na identificação de novos compostos com ação anti-inflamatória (NAIDU et al., 2010).

A warifteína, administrada por via oral, induziu redução no edema de pata induzido por carragenina, um agente flogístico que provoca edema mediado por moléculas tais como PG, histaminas e bradicininas bem como pela produção local de citocinas tais como TNF- α , IL-1 e IL-6. Essa inibição pode ser devida ação desse composto sobre os mediadores acima citados. Nessa perspectiva observamos que a warifteína inibiu tanto o edema provocado pela PGE2 e histamina mas independente de bradicinina. Lavich e col. (2003) demonstram que a inibição de um dos mediadores inflamatórios, quando esse se encontra em associação com os demais, pode resultar na inibição geral do evento inflamatório avaliado, portanto a warifteína está modulando a ação da PGE2, mediador importante na inflamação responsável entre outros efeitos pela formação do edema, um dos cinco sinais cardinais da inflamação. Quanto à metil-warifteína, essa molécula quando administrada pela via oral, inibiu o edema causado pela carragenina apenas nas primeiras horas e não foi capaz de inibir os edemas provocados por PGE2 ou bradicinina.

Os efeitos edematogênicos ocasionados pelos mediadores tais como carragenina, PGE₂, histamina ou bradicinina ocorrem por vias de sinalizações intracelulares. Por exemplo, os receptores de histamina e PGE₂ presentes nas membranas citoplasmáticas de diversos tecidos são do tipo GPCR ligados a proteína Gαq/11 e Gαs respectivamente e que ativam a enzima fosfolipase C e adenililciclase (PAWEL KALINSKI., 2012), todavia os receptores de bradicinina denominados B1 e B2 são do tipo GPCR e estão ligados a proteína Gai e Gαq repectivamente (BERTRAM C. M. et al., 2007). Portanto, a warifteina pode estar bloqueando a via de sinalização produzida pela proteína Gα sem, entretanto inibir a via de sinalização Gai. No caso da indometacina, droga padrão utilizada, o efeito antiedematogenica está associado a inibição direta da enzima COX (YAMADA, T. et al., 1993).

Estudos recentes com a planta *Chondodendrom platyphyllum* (Menispermaceae) demonstram que a fração de alcalóides totais e o alcalóide isolado curina, o qual também é um bisbenzil, semelhante a nossa molécula em estudo, possuem atividade antialérgica com efeito antiinflamatório corroborando assim com nossos resultados, pois essas moléculas apresentam natureza química semelhante (RIBEIRO-FILHO, 2011).

A metilação natural da warifteina parece não potencializar o efeito anti edematogenico da molécula, pois os dados mostraram que a metil-warifteina não foi capaz de inibir e/ou manter a inibição do edema induzido pelos diferentes agentes flogísticos.

Vários estudos com alcalóides têm demonstrado que estas moléculas possuem importantes ações antiinflamatórias (HIKINO et al., 1980; SEOW et al., 1989; TEH et al., 1990; WONG et al., 1992; CHUNG et al., 2011; WANG et al., 2011; DA SILVA et al., 2012). Como exemplos desses estudos os alcaloides bisbenzilisquinolínicos berbamina, cefarantina e tetrandrina obtidos de plantas da família Menispermaceae inibiram as funções de neutrófilos e monócitos, incluindo locomoção, aderência e geração de íons superóxido. Em adição, a tetrandrina inibiu a proliferação de linfócitos induzida por mitógeno, liberação de histamina pelos mastócitos, secreção de IL-1 por monócitos humanos e a ação do PAF em plaquetas (SEOW et al., 1986; SEOW et al., 1988; TEH et al., 1990). Posteriormente, (WONG et al., 1992) Wong et al. (1992) demonstraram que tanto tetrandrina como berbamina diminuíram os níveis de IL-1β, TNF-α e PAF em modelo de inflamação aguda em ratos e ambos os alcaloides foram capazes de reduzir o infiltrado celular (polimorfonucleares) induzido por carragenina. Estes estudos demonstraram que esses alcaloides bisbenzilisquinolínicos apresentam efeito anti-inflamatório via modulação de moléculas e células inflamatórias.

O edema está ligado ao extravasamento de líquidos e proteínas para o tecido, nos primeiros momentos da inflamação e logo após ocorre à migração, da luz do vaso, de células para o tecido inflamado. O ácido acético, quando administrado no peritônio de camundongos, provoca diretamente um aumento de íons H^+ pelas células do endotélio, com consequente contração das células vasculares dependente da ativação de canais iônicos (YUAN, et al. 2012) e indiretamente a produção de PGE2 produzindo o extravasamento do soro para o tecido inflamado (SCHUMACHER, et al. 2010). Os alcaloides testados reduziram a concentração de proteínas provavelmente pela redução na ativação dos canais de Cálcio e/ou de K^+ . Freitas e col (1996) e Assis e col (2013) demonstraram que a warifteína foi capaz de inibir a ativação desses canais iônicos. Portanto esses dados corroboram com os anteriormente publicados sugerindo que o alcaloide da planta *C. sympodialis*, warifteína, independente da metilação, interfere nos canais iônicos responsáveis pelo extravasamento de proteínas no modelo de peritonite induzida pelo ácido acético.

A migração, pela luz do vaso, de células para o tecido inflamado pode ser avaliada pelo modelo de peritonite induzido por zimosan, uma fração insolúvel da parede celular de leveduras que induz a desgranulação de mastócitos e ativação de macrófagos com liberação de quimiocinas, citocinas pro inflamatórias, PAF, PGE e NO (RIDGER et al. 1997). Os tratamentos com os alcaloides não reduziram o número de células no lavado peritoneal de camundongos desafiados com o zimosan indicando, portanto que esses alcaloides não interferiram na migração de macrófagos e, portanto liberação de agentes quimiotáticos e mediadores da inflamação. Já quanto a desgranulação de mastócitos o trabalho anterior de Costa e col (2008) demonstraram que a warifteína inibe a desgranulação de mastócitos sensibilizados com IgE-DNP-BSA e desafiados com DNP entretanto diminui a produção de NO de macrófagos.

A inibição da migração de neutrófilos durante o processo inflamatório agudo pode ser modulada por vários alcaloides. A berberina diminuiu o processo inflamatório intestinal induzido por LPS em camundongos BALB/c com clara redução de neutrófilos via a inibição da ativação do TLR4 (LI et al., 2011). Em adição, (ZHAO et al., 2010) demonstraram que o pré-tratamento de camundongos com neferina (alcaloide bisbenzilisquinolinico) diminuiu o número de neutrófilos e outras células e a atividade da mieloperoxidase. Cefarantina também inibiu o acúmulo de neutrófilos induzido por LPS na cavidade pleural de camundongos com inibição na expressão do NF κ B (MURAKAMI et al., 2000; KUDO et al., 2011). Resultado esse que não foram evidenciados no nosso estudo com os alcaloides warifteína e metil warifteína.

Portanto, o alcaloide warifteina apresentou efeito anti-edematogênico nos modelos de inflamação induzida por agentes flogísticos e seu efeito parece estar associado a receptores ligados à proteína $G\alpha$ e consequentemente à inibição das MAP cinases. Entretanto, parece que a metilação da molécula não interfere no sentido de potencializar o efeito anti-inflamatório. Estudos deverão ser realizados para caracterizar os mecanismos de ação de ambos os alcaloides e identificar se a metilação natural da warifteina interfere ou não em vias diferentes de sinalizações celulares.

CONCLUSÃO

6. Conclusões

Frente aos resultados obtidos nesse estudo concluímos que a warifteina, o alcalóide bisbenzilisquinolinico majoritário, presente no extrato da planta *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) possui efeito anti-edematogenica com:

1. Inibição do edema induzido por carragenina;
2. inibição da ação da prostaglandina E2;
3. Diminuição da permeabilidade vascular;
4. Via independente da bradicinina;
5. Não altera a migração celular para o sítio inflamado no modelo estudado.

A metilação natural da molécula não potencializou seu efeito.

REFERÊNCIAS

7. Referências

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10-dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 199-205, 2003a.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; PIUVEZAM, M. R.; PECANHA, L. M. Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1511-1522, 2003b.

AMANN, R; PESKAR, B. A. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. **Eur J Pharmacol.** v. 447, p. 1-9, 2002.

ASSIS, Á. C. et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, induces relaxation by activating potassium channels in vascular myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, v. 40, p. 37-44, 2013.

BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Ciência e Cultura**, v. 49, p.386-394, 1997.

BATISTA-LIMA, K. V. et al. Anti-inflammatory Activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) Leaf Extract. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 20, p. 275-279, 2001.

BERTRAM, C. M. et al. Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca² and cell migration. **J Leukoc Biol.** v. 81, p 1445-54, 2007.

BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 191-197, 2004.

BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, p.1152-1160, 2006.

BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. **Int Immunopharmacol.**, v.13, p.148-55, 2012.

BRAND, C. et al. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society** ... [et al.], v. 51, n. 6, p. 283-289, 2002.

CERQUEIRA-LIMA, A.T. et al. Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **Current Drug Targets**, v.11, p. 1458-67, 2010.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF; 1984.

CÔRTEZ S.F. Ação espasmolítica de warifteina. Um alcaloide bisbenzilisquinolínico isolado de *Cissampelos sympodialis* EICHL. 1992. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CÔRTEZ, S. F. et al. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. **Phytoterapy Research**, v. 9, p. 579-583, 1995.

COSTA, H. F. et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals, **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 519-525, 2008.

COSTA, H.F. et al. Managing murine food allergy with *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) and its alkaloids, **International Immunopharmacology**, v. 17 300–308, 2013

CHOI, E. Y.; SANTOSO, S.; CHAVAKIS, T. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. **Front Biosci.**, v. 14, p.1596-605, 2009.

CHUNG, Y.-M.; CHANG, F.-R.; TSENG, T.-F. et al. A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 1792-1794, 2011.

DA SILVA, K. A. B. S.; MANJAVACHI, M. N.; PASZCUK, A. F. et al. Plant derived alkaloid (–)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 967-977, 2012.

DE LIRA, G. A. et al. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**, v. 73, p.356-358, 2002.

EHRENFELD, P. et al. Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. **J Leukoc Biol.** v. 80, p. 117-24, 2006.

FERREIRA, J. et al. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1188-1197, 2002.

FREITAS, M. R. et al. Modification of calcium metabolism in rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic Action of warifteine, a bisbenzylisoquiniline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.48, p. 335-338, 1996.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

GILANI, A. H.; ATTA UR, R. Trends in ethnopharmacology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 43-49, 2005.

GILROY, D.W. et al. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **FASEB J.**, v.18(3), p. 489-98, 2004.

GONZALEZ-REY, E.; CHORNY, A.; DELGADO, M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. **Nature reviews Immunology**, v. 7, n. 1, p. 52-63, 2007.

GORINSKY, C.; LUSCOMBE, D. K.; NICHOLLS, P. J. Neuromuscular blocking and local anesthetic activities of warifteine hydrochloride, an alkaloid isolated from *Cissampelos ovalifolia* D.C.. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 147-148, 1972.

HIKINO, H.; KONNO, C.; TAKATA, H. et al. Antiinflammatory principles of Aconitum roots. **Journal of pharmacobio-dynamics**, v. 3, n. 10, p. 514-525, Oct 1980.

INGERSOLL, M. A. et al. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. **Trends Immunol.**, v. 32, p. 470-7, 2011

JONES, B. L.; KEARNS, G. L. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 89, p.189-97, 2011.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1170-1173, 2011.

KOU, J.; NI, Y.; LI, N. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 1, p. 176-180, Jan 2005.

KUDO, K.; HAGIWARA, S.; HASEGAWA, A. et al. Cepharanthine exerts anti-inflammatory effects via NF-kappaB inhibition in a LPS-induced rat model of systemic inflammation. **The Journal of surgical research**, v. 171, n. 1, p. 199-204, Nov 2011.

LARSEN, J. M. et al. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 123, n. 2, p. 486-492, 2009.

LAVICH, T. R. et al. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 462, p. 185-92, 2003.

LI, H. M.; WANG, Y. Y.; WANG, H. D. et al. Berberine protects against lipopolysaccharide-induced intestinal injury in mice via alpha 2 adrenoceptor-independent mechanisms. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 11, p. 1364-1372, Nov 2011.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 10, p. 845-852, 2004.

MARINHO, A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. A validated method for the simultaneous quantitation of bioactive alkaloid markers in the leaf ethanolic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl.: a phenological variation study. **Phytochem Anal.**, v. 23, p.426-32, 2012.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 991-1045, 1994.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, r 7203, p. 428-435, 2008.

MELO, P. S. et al. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicolog Letters**,v.142, p.143-151, 2003.

MONTELEONE, I.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation. **BMC Med**, 2011 Nov 15;9:122 doi: 10.1186/1741-7015-9-122.

MURAKAMI, K.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M. The prevention of lipopolysaccharide induced pulmonary vascular injury by pretreatment with cepharanthine in rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 161, n. 1, p. 57-63, Jan 2000.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 1, p. 3 35, Jan 2004.

NAIDU, P. S. et al. Regulation of inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 334, n. 1, p. 182-190, 2010.

NARUMIYA S. J. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. **Mol Med (Berl)**, v. 10, p.1015-22, 2009.

PIUVEZAM, M. R. et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A- treated BALB/c spleen cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 93-101, 1999.

PORTH, C. M. Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. 3. **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, 2010. 1280

RIBEIRO-FILHO, J. et. al. Curine inhibits eosinophil activation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2013.

RIDGER, V. C. et al. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl)lysine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. **Journal of immunology**, v. 159, n. 1, p. 383-390, 1997.

ROCHA, J. D. et al. Inhibitory effect of the alkaloid warifteine purified from *Cissampelos sympodialis* on B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Planta Med.**, v. 76, p.325-30, 2010.

ROCHA e SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**, v. 43, p.86-90, 1994.

SAMUELSSON, B.; MORGENSTERN, R.; JAKOBSSON, P. J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacological reviews*, v. 59, n. 3, p. 207-224, 2007.

SEOW, W. K.; FERRANTE, A.; LI, S. Y. et al. Suppression of human monocyte interleukin 1 production by the plant alkaloid tetrandrine. **Clinical and experimental immunology**, v. 75, n. 1, p. 47-51, Jan 1989.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHUMACHER, M. A. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. **Pain Pract.**, v. 10, p.185-200,2010.

STADNICKI, A. Intestinal tissue kallikrein-kinin system in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 17p. 645-54, 2011.

STROHMAYER, E. A; KRAKOFF, L. R. Glucocorticoids and cardiovascular risk factors. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 40, p. 409-17, 2011.

SOUSA, L. P. et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 5, p. 895-904, 2010.

TEH, B. S.; SEOW, W. K.; LI, S. Y. et al. Inhibition of prostaglandin and leukotriene generation by the plant alkaloids tetrandrine and berbamine. **International journal of immunopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 321-326, 1990.

THOMAS, G. et al. Bronchodilatory activity of in aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) in the guinea-pig. **Phytomedicine**, v.4, p. 233-238, 1997a.

THOMAS, G. et al. Characterization of the extract from the leaves of *Cissampelos sympodialis*Eichl (Menispermaceae) on spontaneous tone of isolated trachea, cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and intracellular cAMP. **Phytoterapy Research**, v. 11, p. 496-499, 1997b.

TOUSSIROT, E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 11, p. 159-68, 2012.

VANE, J.R; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm Res.** v.47 Suppl 2, p. S78-87, 1998.

VIEIRA, G. C. et al. Inhaled *Cissampelos sympodialis* Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3(+) T Cells. **Phytother Res.** 2012 Aug 30. doi: 10.1002/ptr.4791.

WANG, D.; ZHU, J.; WANG, S. et al. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from *Bulbus Fritillariae Cirrhosae*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1290-1294, 2011.

WIDLANSKY, M. E; et al. Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. **Hypertension**. v. 42, p. 310-5, 2003.

WONG, C. W.; SEOW, W. K.; O'CALLAGHAN, J. W. et al. Comparative effects of tetrandrine and berbamine on subcutaneous air pouch inflammation induced by interleukin-1, tumour necrosis factor and platelet-activating factor. **Agents and actions**, v. 36, n. 1-2, p. 112-118, May 1992.

YAMADA, T. et al Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. **Inflammation**. v. 17, p. 641-62, 1993.

YUAN, S. Y. et al. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. **Microvasc Res.**, v. 83, p.82-8, 2012.